

Н.А. Алексеев, А.И. Жебентяев

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ИОН-ПАРНОЙ ВЭЖХ.

Витебский государственный медицинский университет.

Разработана методика определения тиамина в поливитаминных препаратах и растворах для инъекций методом обращенно-фазовой ион-парной ВЭЖХ. Для повышения эффективности разделения тиамина и других водорастворимых витаминов в подвижную фазу ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - ацетонитрил 60:40) вводили додецилсульфат натрия в концентрации  $3 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

Тиамина бромид (тиамина хлорид, витамин  $\text{B}_1$ ) широко используется для предупреждения и лечения гипо- и авитаминоза  $\text{B}_1$ , а также при невритах, радикулитах, невралгии и др. заболеваниях [4]. Кроме лекарственных препаратов, содержащих одно действующее вещество (таблетки, растворы тиамина для инъекций) выпускаются также сложные лекарственные формы поливитаминных препаратов («Ревит», «Гексавит» и др.). Для определения тиамина в поливитаминных препаратах

используются методы: флуориметрия [2], ВЭЖХ [1, 5, 6, 10], спектрофотометрия в УФ-области спектра (после сорбции тиамина на сорбенте) [8], а также косвенное фотометрическое определение [9]. Флуориметрическое определение, основанное на реакции окисления тиамина до тиохрома с последующей экстракцией бутанолом-1 (или пентанолом-1), отличается высокой чувствительностью, но характеризуется низкой воспроизводимостью и требует применения токсичных растворителей (высшие спирты) и нестойких реактивов (раствор гексацианоферрата (III) калия в 15% растворе гидроксида натрия). Кроме того, при анализе тиамина в лекарственных формах требуется многократное (в 1000 и более раз) разведение растворов, что снижает точность определения. Описанные методики определения тиамина методом ВЭЖХ характеризуются высокой эффективностью и экспрессностью, однако разделение проводится на дорогостоящих колонках [6] в подвижных фазах, содержащих метанол [1, 6, 10]. Альтернативные элюенты, содержащие ацетонитрил и фосфатный буферный раствор [5], не обеспечивают необходимой эффективности разделения тиамина и других компонентов лекарственных смесей, а также не позволяют определять продукты разрушения

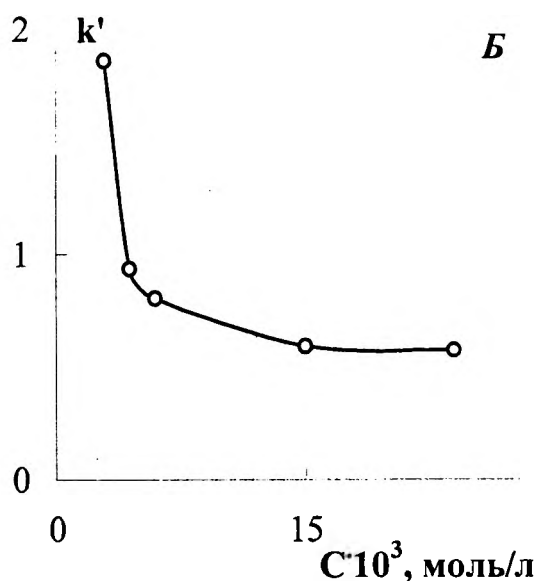
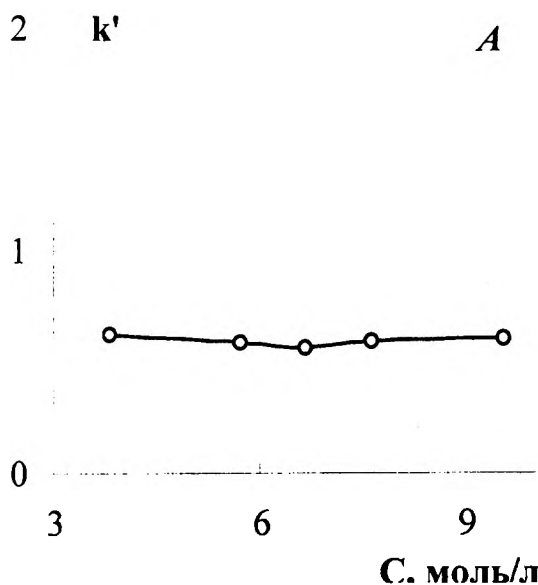


Рис 1. Зависимость коэффициента емкости колонки ( $k'$ ) для тиамина от концентрации ацетонитрила (А) и дигидрофосфата калия (Б) в подвижной фазе на ХМК с привитыми октадецильными группами.

тиамина.

Целью настоящей работы является разработка легко воспроизводимой, чувствительной, селективной и экспрессной методики определения тиамина в лекарственных формах (ампульные растворы, поливитаминные препараты) методом ВЭЖХ с применением ион-парных реагентов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Разделение проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милхром-4» с УФ-детектором. В качестве неподвижной фазы использовали химически модифицированный кремнезем Сепарон  $C_{18}$  ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ), колонка стальная длиной 64 мм и диаметром 2 мм. Подвижная фаза - водный раствор дигидрофосфата калия (концентрация  $10^{-2}$  моль/л) - ацетонитрил (60:40) с добавлением додецилсульфоната натрия (концентрация  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л), рас-

ход элюента 100 мкл/мин. Ацетонитрил (квалификации «х.ч.»), используемый для приготовления подвижной фазы, предварительно подвергали перегонке, вода использовалась бидистиллированная. Значение  $\text{pH}=3,5$  устанавливали прибавлением фосфорной кислоты, измерение  $\text{pH}$  проводили при помощи иономера И-130. Длина волны детекции 244 нм, объем вводимой пробы - 5 мкл. «Мертвый» объем, определенный по нитриту натрия, составил 140 мкл.

Стандартный раствор определяемого вещества готовили из тиамина бромид, дважды перекристаллизованного из 60% этанола, растворением навески препарата 0,1000 г в 40 мл воды и доведением до 100 мл этанолом. Градуировочные растворы (10 - 300 мкг/мл) готовили разведением стандартного раствора 50% водным раствором этанола.

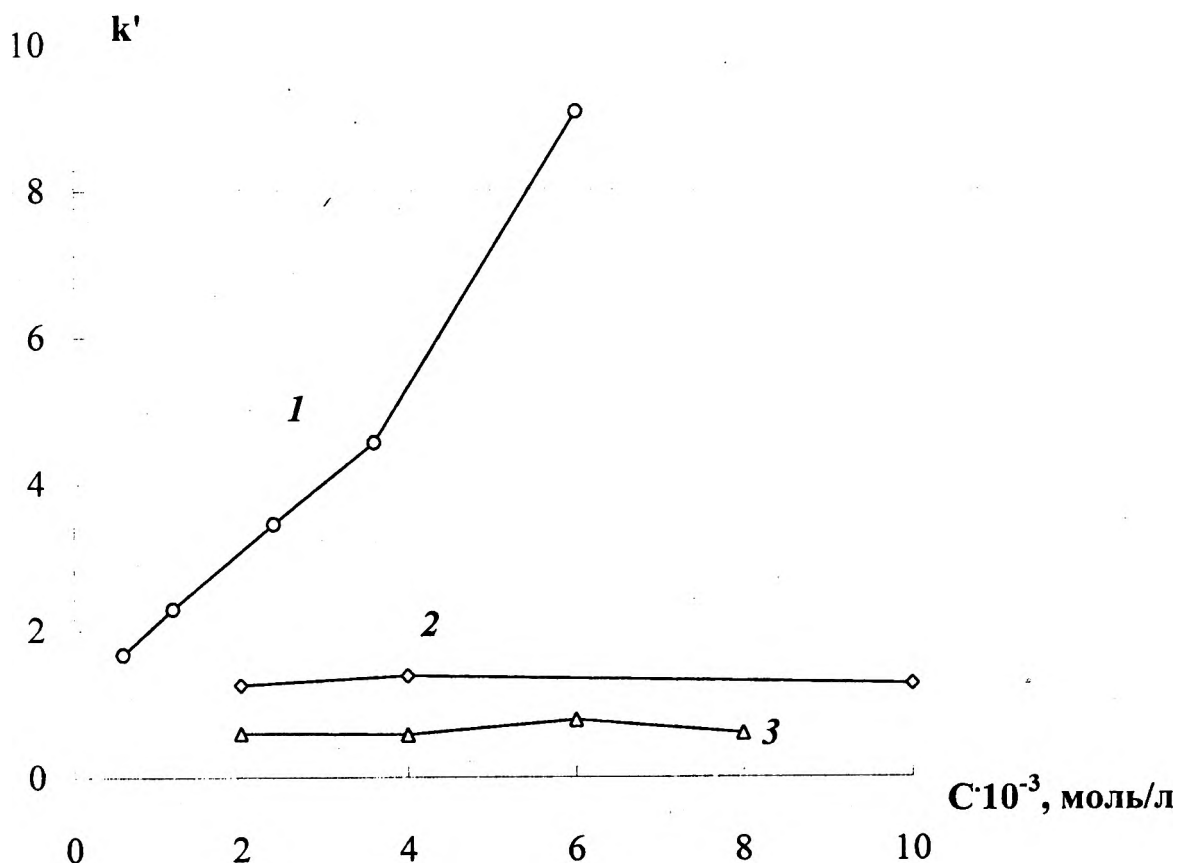


Рис. 2. Зависимость удерживания тиамина ( $k'$ ) от концентрации алкилсульфоната натрия в подвижной фазе на сорбенте Сепарон  $C_{18}$ . Подвижная фаза -  $10^{-2}$  моль/л дигидрофосфат калия - ацетонитрил (60:40),  $\text{pH}$  3,5. 1 - додецилсульфонат, 2 - октилсульфонат, 3 - гептилсульфонат.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Тиамин относится к производным пиридино-тиазола и имеет в молекуле кроме четвертичного атома азота аминогруппу ( $pK_{BH^+} = 4,8$  [7]), что делает молекулу гидрофильной. Поэтому удерживание тиамин на октадецильных группах сорбента незначительно и практически не изменяется с уменьшением количества ацетонитрила в подвижной фазе и концентрации дигидрофосфата калия (рис.1).

Как следует из литературных данных [6,10] в подвижной фазе ацетонитрил - вода (или метанол - вода) тиамин хроматографируется раньше других водорастворимых витаминов (пиридоксина, рибофлавина, цианкобаламина). Однако, при введении ион-парных реагентов (алкилсульфонатов) удерживание тиамин в отличие от других водорастворимых витаминов увеличивается [10], что связано с его способностью к образованию ионных пар, которые адсорбируются на октадецильных группах сорбента значительно лучше самого тиамин. Поэтому нами исследовано влияние длины алкильной цепи алкил-

сульфонатов на удерживание тиамин (рис.2).

Наилучшая эффективность разделения тиамин с другими водорастворимыми витаминами достигается при добавлении в ПФ додецилсульфоната натрия. Как видно из рисунка 2, наибольшее увеличение удерживания тиамин наблюдается в подвижных фазах с додецилсульфонатом натрия, при этом эффективность разделения составляет около  $5,4 \cdot 10^4$  теоретических тарелок на метр. Хроматограммы определения тиамин в присутствии продуктов разрушения (5% раствор тиамин для инъекций) и тиамин в многокомпонентных лекарственных формах (поливитаминные драже «Ревит») представлены на рис. 3. Удерживаемый объем тиамин составляет 0,62 мл ( $k'=3,4$ ), время анализа составило 8 мин.

Количественное определение проводили по градуировочному графику зависимостей площадей пика тиамин от концентрации. Линейный диапазон определяемых концентраций составляет от 10 до 300 мкг/мл. Расчет количества тиамин в драже проводят по формуле:

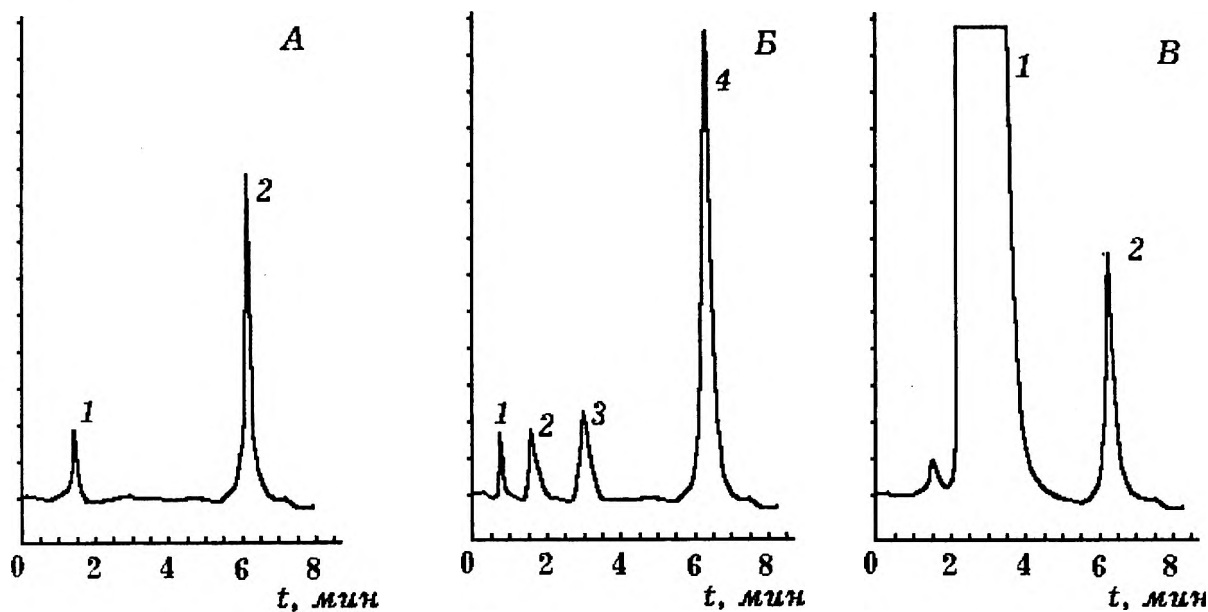


Рис. 3. Хроматограмма стандартного образца тиамин (А), определения тиамин в ампульном растворе (Б) и в драже «Ревит» (В).

Хроматограмма А: 1 - несорбируемый компонент, 2 - тиамин (50 нг в пробе).

Хроматограмма Б: 1 - несорбируемый компонент, 2,3- неидентифицированные продукты разложения тиамин, 4 - тиамин.

Хроматограмма В: 1 - смесь витаминов (рибофлавин, ретинол), 2 - тиамин.

$$m = \frac{C \cdot V}{1000},$$

где  $m$  - масса тиамин бромид в драже, мг,

$C$  - концентрация тиамин в растворе, найденная по градуировочному графику, мкг/мл,

$V$  - объем колбы, мл.

Правильность предлагаемой методики сравнивали с методикой Государственной фармакопеи XI издания [2] на одной и той же серии витаминных препаратов («Ревит»). Результаты определения тиамин в препарате «Ревит» методом флуориметрии и ВЭЖХ приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, величина  $F$ -критерия указывает на значимые различия в воспроизводимости результатов, полу-

ченных с помощью разработанной и фармакопейной методики, средние результаты ( $t$ -критерий [3]) определения тиамин двумя методами значимо не различаются ( $t_{\text{табл}} > t_{\text{расч}}$ ). Разработанная нами методика обладает лучшей воспроизводимостью, чем фармакопейная, и не требует проведения химических реакций, а также экстракции. ВЭЖХ-методика, кроме этого, характеризуется экспрессностью (время ВЭЖХ-определения тиамин с подготовкой пробы составляет 20 мин, экстракционно-флуориметрического определения - 50-60 мин) и достаточно высокой селективностью, что позволяет проводить определение точности дозирования тиамин в многокомпонентных лекарственных формах. Для этого 1 драже растирали в фарфоровой

**Таблица 1.** Результаты экстракционно-флуориметрического и ВЭЖХ-определения тиамин в драже «Ревит» серии 1400598 ( $n=7$ ,  $P=0,95$ ).

Метод определения	Найдено, мг	$S_x$	$S_r$
Флуориметрия	$1,296 \pm 0,122$	0,132	0,10
ВЭЖХ	$1,300 \pm 0,024$	0,023	0,02
$F_{\text{табл}} = 4,28$ $F_{\text{расч}} = 32,80$ $t_{\text{табл}} = 1,94$ $t_{\text{расч}} = 1,49$ ( $f=6$ )			

$f$  - число степеней свободы (рассчитано по [10]).

**Таблица 2.** Результаты определения точности дозирования тиамин в лекарственных формах методом ВЭЖХ ( $n=5$ ,  $P=0,95$ ).

Препарат; содержание тиамин бромид, мг (серия)	Найдено тиамин бромид, мг	$S_x$	$S_r$
«Ревит»; 1,29 (1400598)	$1,12 \pm 0,04$	0,03	0,03
	$1,42 \pm 0,03$	0,02	0,02
	$1,17 \pm 0,03$	0,03	0,02
Раствор тиамин бромид для инъекций, 5% (160698)	$46,33 \pm 1,25$	1,00	0,02
	$49,81 \pm 0,64$	0,52	0,01
	$49,36 \pm 0,80$	0,65	0,01
То же (491097)	$50,53 \pm 0,82$	0,66	0,01
	$51,02 \pm 0,85$	0,69	0,01
	$48,83 \pm 0,69$	0,55	0,01

ступке и смешивали с 10 мл 50% водного раствора этанола, после этого жидкость фильтровали через беззольный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл. Ступку ополаскивали еще 10 мл 50% этанола и фильтровали в ту же колбу. Далее фильтр промывали 2-3 мл 50% этанола и доводили объем до метки тем же растворителем. При определении тиамин в растворах для инъекций 0,5 мл раствора переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили объем до метки водой очищенной. 5 мкл полученного раствора вводили в инжектор хроматографа. Результаты определения точности дозирования тиамин бромида в поливитаминных препаратах (драже «Ревит») и в растворе тиамин бромида для инъекций (5%) приведены в табл. 2.

### ВЫВОДЫ:

Изучено хроматографическое поведение тиамин в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на кремнеземах с привитыми октадецильными группами. Разработана методика определения тиамин в лекарственных формах, которая характеризуется экспрессностью, хорошей воспроизводимостью и точностью.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Анализ водорастворимых витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, С и никотинамида в драже «Гексавит» методом ВЭЖХ / С.В. Ульянова, А.Н. Щавлинский, С.Н. Морев и др. // Фармация - 1993. - Т. 42, N 3. - С. 50 - 51.
2. Государственная фармакопея XI издания, вып. 2, С. 45-46.
3. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. - 268 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - 12-е изд. - М.: Медицина, 1993. - ч. 1. - 736 с. - ч. 2. - 688 с.
5. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в контроле качества многокомпонентных лекарственных форм / А.Х. Лайпанов, В.Э. Слан-

ский, В.Н. Богданова, Е.В. Серегина // «Фармацевтический анализ - науке и практике». - Науч. труды, т. XXX. Москва, 1992. - С. 99 - 104.

6. Amin M., Reusch J. High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins. II. Simultaneous determination of vitamins В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, and В<sub>12</sub> in pharmaceutical preparations // J. Chromatogr. - 1987 - Vol. 390. - P. 448 - 453.
7. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. -2nd. ed. London: The Pharmaceutical Press. - 1986. - 1223 p.
8. Ortega-Barrales P., Fernandez-de Cordova M.L., Monila-Diaz A. Microdetermination of vitamin В<sub>1</sub> in presence of vitamins В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, and В<sub>12</sub> by solid-phase UV spectrophotometry // Anal. Chem. - 1998. - Vol. 70, N 2. - P. 271 - 275.
9. Srividya K., Balasubramanian N. Indirect spectrophotometric determination of thiamine in pharmaceutical preparations // Chem. Pharm. Bull. - 1997. - Vol. 45, N 12. - P. 2100 - 2103.
10. Woollard D.C. New ion-pair reagent for the high-performance liquid chromatographic separation of B-group vitamins in pharmaceuticals // J. Chromatogr. - 1984 - Vol. 301. - P. 470 - 476.

### SUMMARY

N.A. Alekseev, A.I. Zhebentyaev.

### DETERMINATION OF THIAMIN IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY ION-PAIR HPLC.

Reversed-phase ion-pair HPLC technique for determination of thiamin (Vitamin В<sub>1</sub>) in multi-vitamin formulations and injection forms is worked out. Sodium dodecylsulfonate ( $3 \cdot 10^{-3}$  mol/l) was added in mobile phase (aqueous solution KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - acetonitrile 60:40) for increasing the effectivity of separation thiamin from other water-soluble vitamins.